



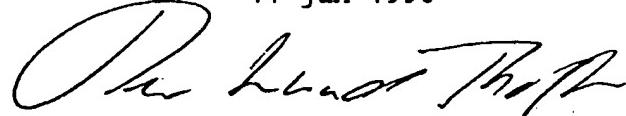
Kongeriget Danmark

PATENT NR. 157560

Patentdirektoratet har i medfør af patentloven af 20. december 1967, som senest ændret ved lov nr. 110 af 11. marts 1986, meddelt patent på den opfindelse, som er angivet i vedlagte patent-skrift. Oplysning om patenthaver, og om dagen for bekendtgørelse om patentets meddelelse og om den dag, fra hvilken patenttiden løber, findes på patent-skiftets første side.

 Patentdirektoratet

11 jun 1990



Per Lund Thoft

Direktør

32

NZAS-0004123

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(45) Bkg. om patentets
meddelelse

11 JUNI 1990

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 157560 B

(21) Patentansøgning nr.: 4499/87

(51) Int.Cl.⁵ C 11 D 7/42

(22) Indleveringsdag: 28 aug 1987

C 12 N 9/20

(41) Alm. tilgængeligt: 01 mar 1988

(44) Fremlagt: 22 jan 1990

(86) International ansøgning nr.: -

(83) Depонering af mikroorganismer Udlev.t.exp.

(30) Prioritet: 29 aug 1986 DK 4117/86 09 okt 1986 DK 4816/86

(71) Ansøger: *Novo-Nordisk A/S; Novo Alle; 2880 Bagsværd, DK

(72) Opfinder: Ida Birgitte *Huge-Jensen; DK, Erik *Gormsen; DK,

(74) Fuldmægtig: -

(54) Enzymatisk detergentadditiv, detergent indeholdende det enzymatiske detergentadditiv og fremgangsmåde til vask af tekstiler.

(56) Fremdragne publikationer

JP ans. nr. 48-62990 (engelsk oversættelse)

(57) Sammendrag:

4499-87

Lipase afledes af *Humicola* sp. (inkl. *Thermomyces* sp.), fortrinsvis *H. lanuginosa*. Det har vist sig, at denne lipase har høj aktivitet ved alkalisk pH og er kompatibel med anioniske overfladeaktive stoffer, og den er mere effektiv som detergentadditiv end tidligere beskrevne detergentlipaser.

B
C
C
C
-

NZAS-0004124

Opfindelsen angår et enzymatisk detergentadditiv, hvis aktive bestanddel er en mikrobielt fremstillet lipase, et detergent indeholdende sådanne additiver og en fremgangsmåde til vask af tekstiler, ved hvilken et sådan detergent 5 anvendes.

Det område, som omfatter enzymatiske additiver i detergenter, har været i hastig vækst i de sidste årtier. Der kan f.eks. henvises til artiklen "How Enzymes Got into Detergents", bd. 12, *Developments in Industrial Microbiology*, en 10 publikation fra Society for Industrial Microbiology, American Institute of Biological Sciences, Washington D.C. 1971, af Claus Dambmann, Poul Holm, Villy Jensen og Mogens Hilmer Nielsen, og til P.N. Christensen, K. Thomsen og S. Branner: "Development of Detergent Enzymes", foredrag holdt den 9. 15 oktober 1986 på "The 2nd World Conference on Detergents" i Montreux, Schweiz.

Proteolytisk detergentadditiv anvendes i udstrakt grad i Europa, USA og Japan. I flere lande indeholder størstedelen af detergenterne, både flydende og i pulverform, 20 protease.

Anvendelsen af lipase som et detergentadditiv er kendt. En omfattende oversigt findes i H. Andree et al.: "Lipases as Detergent Components", *Journal of Applied Biochemistry*, bind 2, 218-229 (1980). Flere eksempler findes i US 25 patentskrift nr. 4,011,169 (spalte 4, linie 65 til spalte 5, linie 68) i GB patentskrift nr. 1,293,613 (side 2, linie 6-29) og i et foredrag af T. Fujii med titlen "Washing of Oil Stains with Lipase" (på japansk), der blev holdt på det 16. Symposium on Washing, der blev afholdt i Tokyo den 17.-18. september 30 1984.

Blandt kendte lipaser, der er anvendt som detergentadditiver, har *Fusarium oxysporum* lipase så vidt vi ved de bedste lipolytiske egenskaber, betragtet ud fra et detergent-anvendelsessynspunkt, jfr. europæisk patentansøgning med 35 publikationsnummer 0 130 064, især sammenligningstabellen på side 27.

Hvis vaskeprocessen gennemføres ved høj temperatur og høj alkalinitet, vil størstedelen af det fedtholdige snavs under alle omstændigheder blive fjernet. Vaskeprocesser ved lav eller middel temperatur (ca. 60°C og derunder) anvendes dog nu sædvanligvis, og ved disse lave temperaturer er de kendte lipaser kun i stand til at op löse en del af det fedtholdige smuds.

Hidtil er effektiviteten af lipolytiske detergent-additiver sædvanligvis blevet målt ved hjælp af EMPA-lapper (EMPA er en forkortelse for Eidgenössische Materialprüfungs- und Versuchsanstalt, St. Gallen, Schweiz) nr. 101 (olivenolie/bomuld) og 102 (olivenolie/uld) ved tillempning af den metode, der er beskrevet i engelsk patentskrift nr. 1.361.386 (især side 4 og 7) og US patentskrift nr. 3.723.250 (især spalte 15-19). På denne måde kan den lipolytiske rensevirkning udtrykkes som forskellen i remissionsværdi delta R. Imidlertid blev her anvendt to direkte mål for den lipolytiske rensevirkning. For det første blev mængden af restfedt bestemt. Derved vises den kombinerede virkning af detergent og lipase. For det andet blev restfedtet analyseret for tilstede værelsen af olie (triglycerid) og ned-brydningsprodukter (mono- og diglycerid og fedtsyre), og antallet af ikke-hydrolyserede glyceridbindinger i olien blev beregnet; dette viser lipasevirkningen mere direkte. Ved anvendelse af disse metoder har det vist sig, at selv den bedst kendte detergentlipase udviser en lipolytisk vaskevirkning, som kunne ønskes forbedret.

Endvidere er det kendt, at lipaser, eftersom de er proteiner, har tendens til at blive angrebet af proteaser, og som tidligere nævnt indeholder mange detergenter i dag proteaser. Der er intet publiceret, som fortæller om detergentlipaser, der har tilfredsstillende stabilitet i tilstede værelsen af protease. Tværtimod har det vist sig, at nogle kendte detergentlipaser har ringe stabilitet i detergentoplösninger i tilstede værelsen af almindeligt anvendte dengtproteaser.

Der er således behov for et lipolytisk detergentadditiv, der udviser en betydeligt bedre lipolytisk detergentvirkning ved økonomisk rimelige lipaseaktiviteter i vaskeflotten, og som er stabil i detergentopløsninger, der indeholder detergentprotease.

Opfindelsen angår et lipolytisk detergentadditiv, der er ejendommelig ved, at lipasen kan fremstilles ved hjælp af en stamme af slægten *Humicola*, inklusive slægten *Thermomyces*.

10 Opfindelsen angår endvidere et detergent omfattende ovennævnte lipolytiske detergentadditiv og en fremgangsmåde til vask af tekstiler, der anvender dette detergent ved pH 7-12.

Detergentlipaserne som anvendes ifølge opfindelsen
15 udviser en vaskevirkning, der er langt bedre sammenlignet med tidlige kendte detergentlipaser. Endvidere er de lipaser, som er anvendt i opfindelsen, stabile i detergentopløsning ved tilstedeværelsen af almindeligt anvendte detergentproteaser, modsat kendte detergentlipaser.

20 Det er beskrevet i japansk patentpublikation nr. 48-62990 (ikke prøvet), at *Humicola lanuginosa* er en lipaseproducent. Imidlertid nævnes det ikke i denne japanske patentansøgning, at *Humicola lanuginosa* lipasen er velegnet som aktiv komponent i et enzymatisk detergentadditiv. Tværtimod fremgår det af fig. 1 i den japanske patentansøgning, at *Humicola lanuginosa* S-38 lipasens pH optimum ligger på ca. 8, og at aktiviteten falder hurtigt når pH-værdien stiger til over 8. Det måtte således forventes, at denne lipase ville være uegnet som detergentadditiv, da pH i vaskeflutter sædvanligvis
25 er langt over 8. Det har dog overraskende vist sig, at *Humicola lanuginosa* S-38 lipasen har et pH optimum langt over 8, se eksempel 1 senere i denne beskrivelse.

Det er endvidere beskrevet i Current Science, aug. 5, 1981, bind 50, nr. 15, s. 680, at *Humicola lanuginosa* lipa-
35 sen kan anvendes til kemisk rensning. Da pH optimummet, der udelukkende vedrører vandige medier, er helt uden betydning

for en lipase til kemisk rensning, betyder ovenstående rede-gørelse intet for egnetheden af *Humicola lanuginosa* lipasen som et lipolytisk detergentadditiv.

Desuden ses det af Agr.Biol.Chem. 37 (11), side 2488 5 (1973), at *H. lanuginosa* lipasen hæmmes meget ved tilsætning af visse anioniske overfladeaktive stoffer. Ifølge vore opdagelser er *H. lanuginosa* lipasen dog overraskende fortrinligt kompatibel med LAS, der er et almindeligt anvendt anionisk overfladeaktivt stof.

10 Fig. 1 - 4 viser pH-aktivitetskurverne, fig. 1 - 2 er for DSM 3819 lipase, og fig. 3 - 4 for DSM 1800 lipase. Fig. 1 og 3 er ved tributyrinmetoden, og fig. 2 og 4 ved olivenolie/PVC-metoden.

Lipaser som anvendes ifølge opfindelsen opnås 15 fortrinsvis fra stammer af thermofil *Humicola* sp., inklusive *thermophil Thermomyces* sp., såsom *H. lanuginosa* (Griffon and Maublanc) Bunce, *H. stellata* Bunce, *H. grisea* var. *thermoidea*, Cooney & Emerson, *H. insolens*, Cooney & Emerson, *Thermomyces ibadanensis*, Apinis & Eggins, *H. hyalothermophila* Moubasher, 20 Mazen og Abdel-Hafez, *H. grisea* var. *indica* Subrahmanyam, *H. brevis* var. *thermoidea* Subrahmanyam og Thirumalachar og *H. brevispora* Subrahmanyam og Thirumalachar.

I en særligt foretrukket udførelsesform for det enzymatiske detergentadditiv ifølge opfindelsen kan lipasen fremstilles 25 fra *H. lanuginosa* (Griffon og Maublanc) Bunce, *H. brevispora* Subrahmanyam og Thirumalachar, *H. brevis* var. *thermoidea* Subrahmanyam og Thirumalachar eller *H. insolens* Cooney & Emerson.

H. lanuginosa er endvidere beskrevet under synonymerne *Thermomyces lanuginosus* Tsiklinsky, *Sepedonium lanuginosum* 30 Griffon og Maublanc, *Sepedonium thermophilum cyclosporum* og *S. thermophilum ovoспорум* Velich, *Acremoniella* sp. Rege, *Acremoniella thermophila* Curzi og *Monotospora lanuginosa* (Griffon og Maublanc) Mason.

Ydermere blev arten Scytalidium thermophilum (Cooney & Emerson) Austwick af Hedger (1975, "The Ecology of thermophilic Fungi in Indonesia", i "Biodegradation et Humification", "Rapport du ler colloque International" - Nancy 1974 (ed. G. Kilbertius, 5 O. Reisinger, A. Mourey & J. A. Cancela Da Fonseca), Sarreguemines: Pierron Editeur - 57206) anset for at tilhøre Humicola insolens.

Lipasen som anvendes ifølge opfindelsen kan fremstilles af en af følgende stammer:

| 10 taxonomisk benævnelse | internt Nr. | deponeringsnr. | deponerings- dato |
|---------------------------------|-------------|----------------|----------------------|
| H. lanuginosa | A 1231 | DSM 3819 | 13. aug 1986 |
| H. lanuginosa | H 126 | DSM 4109 | 4. maj 1987 |
| H. brevispora | A 2121 | DSM 4110 | 4. maj 1987 |
| 15 H. brevis var. thermoidea | A 2106 | DSM 4111 | 4. maj 1987 |
| H. insolens | C 579 | DSM 1800 | 1. okt 1981 |

DSM står for Deutsche Sammlung von Mikroorganismen. Stammerne er deponeret under Budapesttraktatens bestemmelser.

20 Lipase til brug i opfindelsen kan fremstilles ved aerob dyrkning af en af ovenstående stammer i henhold til de i teknikken kendte retningslinier, f.eks. som i de senere angivne eksempler.

25 pH-afhængigheden af lipaseaktiviteten blev bestemt ved en traditionel metode, hvor tributyrin blev anvendt som substrat ved 30°C i en pH-stat og med gummi arabicum som emulgeringsmiddel. Aktiviteten ved forskellige pH-værdier blev fundet udfra forbruget af alkali overfor tid.

pH-afhængigheden blev også checket med et mere 30 realistisk substrat, nemlig olivenolie, der var adsorberet på PVC (i henhold til US patentskrift 4,284,719).

pH-aktivitetskurverne for lipase fra H. lanuginosa DSM 3819 fremgår af fig. 1 (tributyrin) og fig. 2 (olivenolie/PVC). Kurverne for DSM 4109, DSM 4110 og DSM 4111 var

tilsvarende, idet de viste optimum ved pH 10,0 - 10,5 ved begge metoder. pH-aktivitetskurverne for lipase fra H. insolens DSM 1800 fremgår af fig. 3 (tributyrin) og fig. 4 (olivenolie/PVC):

5 Isoelektrisk fokusering blev udført på de fem lipaser, hvorefter et lag med tributyrin blev lagt ovenpå for at påvise lipaseaktiviteten. Det viste sig, at DSM 3819, DSM 4109, DSM 4110 og DSM 4111 alle har lipaseaktiviteter med pI omkring 4,5, mens DSM 1800 har størstedelen af dets lipase-
10 aktivitet med pI omkring 9,0 - 9,5 og kun en ubetydelig mængde lipaseaktivitet med pI omkring 4,5.

Ved en foretrukket udførelsesform tilvejebringes det enzymatiske detergentadditiv ifølge opfindelsen som et ikke-støvende granulat eller som en væske. Disse er egnede til
15 anvendelse i henholdsvis pulverdetergenter og flydende deters-
genter. Granulater kan fremstilles på flere forskellige måder. Der kan henvises til britisk patentskrift nr. 1,362,365, som beskriver fremstillingen af enzymholdigt granulat til anvend-
else som detergentadditiver ved hjælp af et apparat omfattende
20 en ekstruder og en sfæronisator (solgt som MAMUMERIZER®), og til US patentskrift nr. 4,106,991, som beskriver fremstillingen af enzymholdigt granulat til anvendelse som detergentaddi-
tiver ved hjælp af en tromlegranulator.

Hvad angår en flydende formulering har lagerstabiliteten en tendens til at være utilstrækkelig, og en væske med et enzymstabiliseringsmiddel er derfor foretrukket. Stabiliseringssmidler kan være propylenglycol eller andre midler, der er kendt som stabiliseringsmidler til enzymopløsninger. Som det fremgår senere i denne beskrivelse har en ren vandig op-
30 løsning af lipasen som anvendes ifølge opfindelsen en ringe lagerstabilitet, men den kan forbedres betydeligt ved at inkludere stabiliseringsmidler, f.eks. propylenglycol.

I en særligt foretrukket udførelsesform for det enzymatiske detergentadditiv ifølge opfindelsen er lipase-
35 aktiviteten over ca. 10.000 LU/g additiv. Lipaseenhed (LU)
bliver defineret senere i denne beskrivelse. På denne måde dannes en passende lipaseaktivitet i vaskeflotten, når deter-

gentadditivet tilsættes til detergentet i en mængde af 0,1 til 5,0 g/100 g detergent, og når detergentet tilsættes til vaskeflotten i en mængde af 0,5 - 20 g detergent/l vaskeflotte.

- I en særligt foretrukket udførelsesform indeholder
- 5 det enzymatiske detergentadditiv ifølge opfindelsen andre detergentenzymer udover lipasen, såsom protease, amylase eller cellulase. Alkaliske *Bacillus*-proteaser er foretrukket på grund af deres velkendte virkning som detergentproteaser. Som sådanne enzymer kan det proteolytiske enzym ALCALASE® fra Novo
- 10 Industri A/S, fremstillet mikrobielt ved dyrkning af *Bacillus licheniformis*, eller de proteolytiske enzymer SAVINASE® og ESPERASE®, også fra Novo Industri A/S, fremstillet i henhold til US patentskrift nr. 3,723,250, anvendes. Det blandede enzymatiske additiv kan fremstilles enten ved at blande et
- 15 tidligere fremstillet granulat af proteinase med et tidligere fremstillet granulat af lipase, eller ved at blande et koncentrat af proteinase med et koncentrat af lipase og derefter indføre blandingen i et granuleringsapparat, sammen med de sædvanlige granuleringshjælpemidler.
- 20 Nutildags er protease en almindelig detergentbestanddel, og som det vil fremgå senere, er lipaser som anvendes ifølge opfindelsen i udstrakt grad kompatible i detergentopløsninger med vigtige detergentproteaser, såsom de ovenfor angivne. Hvis både lipase og protease skal tilsættes
- 25 til et detergent kan det være passende at anvende dem i form af et blandet additiv.

I en særligt foretrukket udførelsesform for det enzymatiske detergentadditiv ifølge opfindelsen er den proteolytiske aktivitet mellem ca. 0,5 og ca. 3,0 Ansonenheder/g

30 additiv. På denne måde tilvejebringes en passende proteolytisk aktivitet i vaskeflotten når detergentadditivet tilsættes til detergentet i en mængde af 0,2 - 2 g/100 g detergent, og når detergentet tilsættes til vaskeflotten i en mængde af 0,5 - 20 g detergent/l vaskeflotte. Den velkendte Anson hæmoglobin-

35 metode for proteolytisk aktivitet er beskrevet i Journal of General Physiology, 22, 79-89 (1959).

I overensstemmelse med den tidligere nævnte udførelsesform for additivet ifølge opfindelsen kan detergentet ifølge opfindelsen være et pulver eller et flydende detergent, og kan om ønsket omfatte andre detergentenzymer, såsom protease, amylase eller cellulase, enten i det samme additiv eller som separate additiver.

I en særligt foretrukket udførelsesform for detergentet ifølge opfindelsen indeholder detergentet det enzymatiske detergentadditiv ifølge opfindelsen i en mængde af mellem 0,1 og 5% w/w, mere fortrinsvis i en mængde af 0,2 - 2% w/w. På denne måde tilvejebringes en passende balance mellem enzymvirkningen og virkningen af andre detergentbestanddele.

Detergentet anvendes typisk i koncentrationer på 0,5 - 20 g/l vaskeflotte, og passende lipaseaktivitet i vaskeflotten er 1.000 - 10.000 LU/l, mere fortrinsvis 1.000 - 5.000 LU/l. Således er lipaseaktiviteten i detergentet i en foretrukket udførelsesform 50 - 20.000 LU/g, fortrinsvis 50 - 10.000 LU/g, mere fortrinsvis 250 - 2.000 LU/g og mest fortrinsvis 500 - 2.000 LU/g detergent.

Som ovenfor nævnt er den foretrukne lipase i additivet over 10.000 LU/g, og denne tilsættes til detergenterne i mængder af fortrinsvis 0,1 - 5% w/w og mere fortrinsvis 0,2 - 2% w/w. Følgelig er lipaseaktiviteten i detergenterne ifølge en anden foretrukket udførelsesform 10 - 500 LU/g, mere fortrinsvis 20 - 200 LU/g detergent.

I en særligt foretrukket udførelsesform omfatter detergentet ifølge opfindelsen andre detergentenzymer foruden lipasen, mest fortrinsvis en protease. Foretrukne detergentproteaser er de, der allerede er nævnt. Lipase og protease kan tilsættes til detergentet enten separat eller i form af et blandet additiv. Som allerede nævnt anvendes proteaser almindeligvis i detergenter, og lipaser som anvendes ifølge opfindelsen udviser en bemærkelsesværdig stabilitet i detergentopløsning med de kommersielt vigtige proteaser. I overensstemmelse med ovennævnte foretrukne værdier for proteaseaktivitet foretrækkes en

proteaseaktivitet i detergentet på 0,0005 - 0,15 AU/g, mere fortrinsvis 0,001 - 0,060 AU/g, endnu mere fortrinsvis 0,003 - 0,025 AU/g og mest fortrinsvis 0,006 - 0,010 AU/g detergent.

I en særligt foretrukket udførelsesform for detergent ifølge opfindelsen omfatter det overfladeaktive materiale 30-100% anionisk og 0-70% ikke-ionisk overfladeaktivt stof, mest fortrinsvis 50-100% anionisk og 0-50% ikke-ionisk overfladeaktivt stof. Vaskevirkning af lipase som anvendes ifølge opfindelsen er særlig udtalt i detergenter med et højt indhold af anioniske midler, såsom LAS (lineær alkylbenzensulfonat).

I en særligt foretrukket udførelsesform i vaskeprocessen ifølge opfindelsen indeholder vaskeflotten detergent ifølge opfindelsen i en mængde af mellem 0,5 og 20 g/l vaskeflotte. På denne måde tilvejebringes en passende lipaseaktivitet i vaskeflotten, nemlig typisk mellem 1.000 og 10.000 LU/l vaskeflotte, fortrinsvis mellem 1.000 og 5.000 LU/l vaskeflotte.

EKSEMPLER

20 Lipaseaktivitet

Fremgangsmåden er baseret på hydrolyse af tributyrin i en pH-stat. 1 LU (Lipase Unit - lipaseenhed) er mængden af enzym, som frigør 1 µmol titrerbar smørsyre pr. minut ved 30°C, pH 7.0 med gummi arabicum som et emulgeringsmiddel.

Yderligere detaljer gives i Novo Analytical Method AF 95/5, som efter anmodning kan rekHIReres.

EKSEMPEL 1

Lipase fra H. lanuginosa DSM 3819

Fyrre 500 ml rystekolber hver med 200 ml PL-lc medium (sammensætning følger) blev hver podet med 0,2 ml af en 5 opslæmning af sporer, fremstillet ud fra skrårør med *H. lanuginosa* DSM 3819, voksende på YPG-agar (sammensætning følger) i 5 dage ved 45°C. De således podede rystekolber blev rystet i 3 dage ved 45°C med en hastighed på 240 omdrejninger pr. minut. På dette tidspunkt var lipaseaktiviteten i den opsamlede væske 10 (6,7 liter) 104 LU/ml. Cellerne blev fjernet ved centrifugering ved en hastighed på 4000 omdrejninger pr. minut i 25 minutter. Derved fik man 5,9 liter supernatant. Supernatanten blev filtreret gennem et 10 µ nylonfilterstof og derefter koncentreret 8 gange ved ultrafiltrering på Pellicon UF Cassette system 15 (membraner med en nominel molekylevægtsgrænse på 10.000).

UF-koncentratet (endeligt volumen på 740 ml) blev om dannet til råpulver ved frysetørring. Dette råpulver udviste en lipaseaktivitet på 13.310 LU/g.

Sammensætningen af YPG-agar var som følger:

| | | | |
|----|---------------------------------------|-----|-----|
| 20 | Gærestrakt, Difco | 4 | g/l |
| | Glucose | 15 | g/l |
| | K ₂ HPO ₄ | 1 | g/l |
| | MgSO ₄ , 7H ₂ O | 0,5 | g/l |
| | Agar | 20 | g/l |
| 25 | Autoklavering ved 121°C i 40 minutter | | |

Sammensætningen af PL-lc medium var som følger:

| | | | |
|---|---------------------------------------|-----|-----|
| | Pepton | 15 | g/l |
| | Tween-80 | 18 | g/l |
| | MgSO ₄ , 7H ₂ O | 2 | g/l |
| | CaCl ₂ , 2H ₂ O | 0,1 | g/l |
| 5 | Nalco-10 | 2 | g/l |
| | pH før autoklavering | 6,0 | |
| | Autoklavering ved 121°C i 40 minutter | | |

EKSEMPEL 2

Lipase fra andre Humicola-stammer

10 Stamme DSM 4111 blev gæret på medium PL-1c, stamme DSM 4109 på medium GT, stamme DSM 4110 på medium GTS-1, og Stamme DSM 1800 på medium LR-8ST, hovedsageligt som beskrevet i eksempel 1.

| 15 | | Sammensætning af gæringsmedium | | | |
|----|---------------------------------------|--------------------------------|---------|---------|-----|
| | | GT | GTS-1 | LR-8ST | |
| | Gærestrakt (65% tørstof) | g/l | 22,5 | 15 | 0 |
| 20 | Pharmamedia | - | 0 | 0 | 50 |
| | Tween 80 | - | 18 | 5 | 5 |
| 25 | Span 80 | - | 0 | 5 | 5 |
| | MgSO ₄ , 7H ₂ O | - | 2 | 2 | 0,5 |
| | CaCl ₂ , 2H ₂ O | - | 0,1 | 0,1 | 0 |
| 30 | K ₂ HPO ₄ | - | 0 | 0 | 5 |
| | NaNO ₃ | - | 0 | 0 | 1 |
| 35 | Nalco-10 | - | 5 | 2 | 0 |
| | pH før autoklavering | ca. 6,5 | ca. 6,0 | ca. 7,0 | |

Udvinding fra kulturvæskerne blev hovedsageligt udført som beskrevet for DSM 3819 i eksempel 1. I tilfældet med lipase fra DSM 4109 blev et ekstra oprensningstrin udført forud for frysetørring, idet UF-concentratet blev udfældet med acetone, 5 hvorefter det udfældede blev opløst igen i vand og frysetørret. De endelige frysetørrede pulvere udviste følgende lipaseaktiviteter:

| Stamme | DSM 4111 | DSM 4109 | DSM 4110 | DSM 1800 |
|--------|----------|----------|----------|----------|
| LU/g | 32.000 | 211.000 | 6.600 | 1.800 |

10 Vaskemetode

Det prøvemateriale, der blev anvendt i vaskeforsøg, var bomuldsstof (med en overfladevægt svarende til ca. 1,2 g/50 cm²) imprægneret med olivenolie (Sigma 0-1500). Lapperne blev fremstillet ved at påføre 50 eller 85 µl (som angivet) 15 olivenolie, opvarmet til 50-60°C, i midten af hver prøvelap (7 x 7 cm) ved hjælp af en mikropipette. Efter oliepåføringen blev lapperne ældet ved stuetemperatur i 2 dage.

Lipasepræparaterne fra eksempel 1 og 2 blev anvendt og identificeret ved stammenunderne.

20 Til sammenligning anvendtes endvidere i dette eksempel et lipolytisk pulver på basis af *Fusarium oxysporum*, fremkommet som beskrevet i eksempel 23 i europæisk patentansøgning med publikationsnummer 0 130 064, som repræsenterende det mest effektive kendte lipolytiske detergentadditiv. *Fusarium oxy-*
25 *sporum* lipasepræparatets aktivitet var 90.000 LU/g.

Lipaserne blev bedømt ved vaskeforsøg i en Terg-O-Tometer forsøgsvaskemaskine. Terg-O-Tometer forsøgsvaskemaskinen er beskrevet hos Jay C. Harris, Detergency evaluation and testing, Interscience Publishers Ltd., 1954, side 60 - 61.

30 Vaskeforsøgene udførtes under følgende betingelser:

| | | |
|---|----------------------|--|
| | Omrøring | 100 omdrejninger pr. minut |
| | Vandets hårdhedsgrad | 18°dH (fra hanen), hvis andet ikke er angivet |
| | stof/væske forhold | 7 lapper/1000 ml |
| 5 | skylning | 15 min under løbende hane |

Mængden af olie, der var indeholdt i 7 lapper med 85 μ l hver er ca. 535 mg (vægtfylde 0,90).

Efter skylning blev lapperne lufttørret. Restindholdet af olie i lapperne blev bestemt ved Soxhlet ekstraktion med n-hexan i 5 timer efterfulgt af gravimetrisk bestemmelse af restmængden.

Sammensætningen af restolien blev analyseret ved hjælp af TLC-FID (TLC-FID er en forkortelse af "thin layer chromatography/flame ionization detector", og fremgangsmåden er beskrevet i Lipids, vol. 18, nr. 10 (1983), side 732) metoden, hvor der anvendes en Iatroscan TH-10 (Iatron Lab. Inc., Tokyo) kombineret med en Chromatocorder II (System Instruments Co., Ltd., Tokyo) integrator ved følgende betingelser:

| | | |
|----|--------------------|---|
| | fast fase | Chromarod S-II (Iatron) |
| 20 | mobil fase | Hexan/ethylæter/eddikesyre (60:50:2 v/v/v) |
| | hydrogentilførsel | 160 ml/min |
| | lufttilførsel | 2000 ml/min |
| | scanningshastighed | 30 sek. pr. scanning |

25 Prøver til TLC-FID analysen blev fremstillet som følger. Efter gravimetrisk bestemmelse af restmængden blev det tørrede ekstrakt opløst igen i 20 ml hexan, og 5 ml intern standard (lithocholsyre, 12,5 mg/ml) opløst i ethanol blev tilsat. Til hver analyse brugtes 1 μ l af prøven.

30 Baseret på standardkurver for triolein, diolein, monoolein og oliesyre blev restoliens relative sammensætning (% w/w) beregnet.

Antallet af uhydrolyserede glyceridbindinger i restolien blev beregnet ved følgende formel:

$$n = 10 \times M \left(\frac{3}{885} \times X_{TG} + \frac{2}{621} \times X_{DG} + \frac{1}{357} \times X_{MG} \right) \quad (\mu \text{ mol})$$

hvor X_{TG} = procent triglycerid (% w/w)

X_{DG} = procent diglycerid (% w/w)

5 X_{MG} = procent monoglycerid (% w/w)

M = restmængden af olie (mg)

885, 621 og 357 er molekylevægten for henholdsvis triolein, diolein og monolein.

EKSEMPEL 3

10 Virkningen af vasketemperatur

Dette eksempel demonstrarerer virkningen af *Humicola lanuginosa* lipasen (DSM 3819) i et anionisk detergent ved forskellige vasketemperaturer.

Detergentsammensætning: LAS (0,5 g/l), Na_2CO_3 (1,0 g/l)

15 Vasketid: 20 minutter

Lipasedosering: 3000 LU/l

pH: 9,5

Besmudsning: 85 μl olivenolie

LAS er lineær alkylbenzensulfonat (Nansa HS80/S, Albright & 20 Wilson), et anionisk overfladeaktivt stof.

| Temp. | Uden | | <i>Fusarium oxysporum</i> | <i>Humicola lanuginosa</i> |
|-------|----------------------|---------------|---------------------------|----------------------------|
| | lipase | Restolie (mg) | | |
| | 185 | 187 | 165 | |
| 25 | 30°C n (μ mole) | 590 | 571 | 360 |
| | Restolie (mg) | 187 | 192 | 157 |
| | 50°C n (μ mol) | 606 | 628 | 432 |

EKSEMPEL 4

Virkning af vasketid

I dette eksempel vises virkningen af *Humicola lanuginosa* lipasen (DSM 3819) ved at anvende forskellige vasketider.

5 Detergentsammensætning: LAS (0,5 g/l), Na_2CO_3 (1,0 g/l)

Temperatur: 30°C

Lipasedosering: 3000 LU/l

pH (initial): 9,5

Besmudsning: 85 μl olivenolie

| 10 Vasketid (min.) | | Uden lipase | <i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i> | <i>Humicola</i> <i>lanuginosa</i> |
|-----------------------|------------------------|----------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| 20 | Restolie (mg) | 185 | 187 | 165 |
| | n ($\mu\text{ mol}$) | 590 | 571 | 360 |
| 15 | Restolie (mg) | 177 | 167 | 128 |
| | n ($\mu\text{ mol}$) | 568 | 526 | 246 |
| 60 | Restolie (mg) | 141 | 147 | 93 |
| | n ($\mu\text{ mol}$) | 465 | 454 | 153 |
| 90 | Restolie (mg) | 139 | 135 | 78 |
| | n ($\mu\text{ mol}$) | 431 | 419 | 111 |

20 EKSEMPEL 5

Virkning af vandets hårdhedsgrad ved vask

Dette eksempel viser indflydelsen af vandets hårdhedsgrad på vaskevirkningen af *Humicola lanuginosa* lipase (DSM 3819). Hårdhedsgraden ($^{\circ}\text{dH}$ = tysk hårdhed) blev indstillet ved 25 at blande vand fra hanen med destilleret vand.

Detergentsammensætning: LAS (0,5 g/l), Na_2CO_3 (1,0 g/l)
 Temperatur: 30°C
 Vasketid: 20 minutter
 Lipasedosering: 3000 LU/l
 pH (initial): 9,5
 Besmudsning: 85 µl olivenolie

| | Hårdhedsgrad °dH | Uden lipase | Fusarium oxysporum | Humicola lanuginosa |
|-------|---------------------|----------------|-----------------------|------------------------|
| 10 | 0 Restolie (mg) | 254 | 244 | 242 |
| | n (µ mol) | 820 | 752 | 627 |
| 12 | 6 Restolie (mg) | 210 | 192 | 173 |
| | n (µ mol) | 670 | 595 | 415 |
| 15 18 | 12 Restolie (mg) | 182 | 179 | 170 |
| | n (µ mol) | 579 | 548 | 405 |
| | 18 Restolie (mg) | 185 | 187 | 165 |
| | n (µ mol) | 590 | 571 | 360 |

EKSEMPEL 6

Virkning af lipasedosering ved vask

Dette eksempel viser, hvilken betydning dosering af H. lanuginosa lipase har ved vaskeudførelser under anvendelse af acetonefraktioneret lipasepulver fra DSM 3819.

Detergentsammensætning: LAS (0,5 g/l), Na_2CO_3 (1,0 g/l)
 Vasketid: 20 minutter
 Temperatur: 30°C
 pH (initial): 9,5
 Besmudsning: 85 µl olivenolie

De besmudsede lapper, der anvendtes, var fra en anden portion end i eksemplerne 2 - 5, så resultaterne kan ikke sammenlignes direkte.

| Lipasedosering, LU/ml | 0 | 500 | 1500 | 3000 | 6000 | 10,000 |
|-----------------------|-----|-----|------|------|------|--------|
| Restolie (mg) | 232 | 209 | 202 | 202 | 194 | 176 |
| n (μ mol) | 761 | 558 | 521 | 471 | 437 | 363 |

EKSEMPEL 7

5 Sammenligning af Humicola lipaser ved vask

Dette eksempel sammenligner den vaskevirkning, der blev opnået med lipase fra *H. lanuginosa* (DSM 4109), *H. brevis* var. *thermoidea* (DSM 4111), *H. brevispora* (DSM 4110) og *H. insolens* (DSM 1800).

| | | |
|----|--|-----------------------|
| 10 | Detergentsammensætning: LAS | 0,50 g/l |
| | Talgsæbe | 0,05 - |
| | Alkoholethoxylat (C ₁₂₋₁₄ , 6EO) | 0,10 - |
| | Alkoholethoxylat (C ₁₆₋₁₈ , 30EO) | 0,02 - |
| | Zeolite | 1,20 - |
| 15 | Na ₂ CO ₃ | 0,50 - |
| | Natriummetsilicat | 0,10 - |
| | EDTA (titriplex III) | 0,01 - |
| | Na ₂ SO ₄ | 2,00 - |
| | Temperatur: | 30 °C |
| 20 | Vasketid: | 20 minutter |
| | Lipasedosering: | 6000 LU/l |
| | pH: | 9,5 |
| | Besmudsning: | 50 μ l olivenolie |

| <u>Lipasepræparat</u> | <u>n (μ mol)</u> |
|---------------------------|------------------|
| intet | 546 |
| H. lanuginosa | 454 |
| H. brevis var. thermoidea | 468 |
| 5 H. brevispora | 484 |
| H. insolens | 350 |

EKSEMPEL 8Stabilitet af Humicola lipase overfor protease

Den udmærkede stabilitet af *Humicola* lipaser i deters 10 gentopløsninger indeholdende proteolytiske enzymer vises i nedenstående.

Et *Humicola lanuginosa* præparat (DSM 4109) sammenlignes med den *Fusarium oxysporum* lipase, der blev anvendt i de foregående eksempler og med det kommersielle lipasepræparat, 15 Amano P (Amano Pharmaceutical co. Ltd., Nagoya, Japan), som er fremstillet af *Pseudomonas fluorescens*.

De alkaliske *Bacillus* proteaser ALCALASE®, SAVINASE® og ESPERASE® anvendtes. Disse er kommersielle detergentproteaser fra Novo Industri A/S, Danmark.

20 Den proteolytiske aktivitet blev bestemt med kasein som substratet. En Kasein proteaseenhed (CPU) blev defineret som mængden af enzym, der frigør 1 mM af primære aminogrupper (bestemt ved sammenligning med en serinstandard) pr. minut under standardbetingelser, dvs inkubation i 30 minutter ved 25°C og pH 25 9,5. En 2% (w/v) opløsning af kasein (Hammersten, solgt af Merck A.G., Vesttyskland) blev fremstillet med Universalpufferen, der er beskrevet i Britton og Robinson (Journ.Chem.Soc. 1931, s. 1451) indstillet til pH 9,5.

Detergent: 1,3 g/l af et fosfat-frit pulver indeholdende 25% overfladeaktivt stof (alfa-olefin sulfonate (AOS) og lineær alkylbenzensulfonat (LAS)), natriumsulfat, zeolite, natriumsilicat og optisk hvidt.

5

Vandets hårdhedsgrad: 4,5°dH
 pH: 10,0 (indstillet)
 Temperatur: 25°C
 10 Lipaseaktivitet (initial): 3000 LU/l
 Proteaseaktivitet: 0 eller 0,05 CPU/l
 Resterende lipaseaktivitet (%):

1) Protease: SAVINASE®

| 15 | Lipase | Inkubationstid (min) | | | | |
|----|-------------------------|----------------------|----|----|----|----|
| | | 0 | 15 | 30 | 60 | 90 |
| | Humicola lanuginosa | 100 | 99 | 94 | 91 | 89 |
| | Fusarium oxysporum | 100 | 32 | 14 | 3 | - |
| 20 | Pseudomonas fluorescens | 100 | 1 | 0 | - | - |

2) Protease: Ingen

| 25 | Lipase | Inkubationstid (min) | | | | |
|----|-------------------------|----------------------|-----|----|-----|----|
| | | 0 | 15 | 30 | 60 | 90 |
| | Humicola lanuginosa | 100 | 101 | 99 | 102 | 96 |
| | Fusarium oxysporum | 100 | 57 | 42 | 18 | 6 |
| | Pseudomonas fluorescens | 100 | 94 | 94 | 88 | 90 |

| | | |
|------------|---------------------------------|----------|
| Detergent: | LAS | 0,40 g/l |
| | Alkoholethoxylat (Berol 065) | 0,15 g/l |
| | Talgsæbe | 0,15 g/l |
| | Natriumtripolyfosfat | 1,50 g/l |
| 5 | Natriummetsasilicat | 0,40 g/l |
| | CMC | 0,05 g/l |
| | Na ₂ SO ₄ | 2,10 g/l |

Vandets hårdhedsgrad: 18°dH

pH: 9,5

10 Temperatur: 30°C

Lipaseaktivitet: 3000 LU/l

Proteaseaktivitet: 0 eller 0,05 CPU/l

1) Protease: SAVINASE®

| 15 | Lipase | Inkubationstid (min) | | | | |
|----|-------------------------|----------------------|----|----|----|----|
| | | 0 | 15 | 30 | 60 | 90 |
| | Humicola lanuginosa | 100 | 99 | 98 | 97 | 97 |
| | Fusarium oxysporum | 100 | 5 | 0 | - | - |
| 20 | Pseudomonas fluorescens | 100 | 0 | - | - | - |

2) Protease: ALCALASE®

| 25 | Lipase | Inkubationstid (min) | | | | |
|----|-------------------------|----------------------|----|----|----|----|
| | | 0 | 15 | 30 | 60 | 90 |
| | Humicola lanuginosa | 100 | 98 | 97 | 95 | 95 |
| | Fusarium oxysporum | 100 | 24 | 4 | 0 | - |
| | Pseudomonas fluorescens | 100 | 18 | 0 | - | - |

3) Protease: ESPERASE®

| Lipase | Inkubationstid (min) | | | | |
|-------------------------|----------------------|----|----|----|----|
| | 0 | 15 | 30 | 60 | 90 |
| 5 Humicola lanuginosa | 100 | 97 | 96 | 96 | 98 |
| Fusarium oxysporum | 100 | 20 | 0 | - | - |
| Pseudomonas fluorescens | 100 | 0 | - | - | - |

4) Protease: Ingen

| Lipase | Inkubationstid (min) | | | | |
|----------------------------|----------------------|-----|-----|-----|----|
| | 0 | 15 | 30 | 60 | 90 |
| Humicola lanuginosa | 100 | 96 | 95 | 96 | 94 |
| Fusarium oxysporum | 100 | 30 | 10 | 0 | - |
| 15 Pseudomonas fluorescens | 100 | 101 | 102 | 102 | 99 |

Det ses, at Humicola lipåsen ifølge opfindelsen er meget stabil i detergentopløsninger med protease i modsætningen til kendte detergentlipaser (Fusarium og Pseudomonas).

20 EKSEMPEL 9

Stabiliseret flydende Humicola lipasepræparat

Lipasestabilitet i opløsninger med forskellige stabiliseringmidler blev undersøgt.

Lipase: Humicola lanuginosa (DSM 4109)
 25 Lagringstemp: 30°C
 pH: 7,0

Rodalon® blev tilsat til alle præparerterne som konserveringsmiddel (0,2 mg aktivt stof pr. ml).

Resultater:

| | 1,2-propandiol (ml/ml) | Sorbitol (g/ml) | CaCl ₂ .2H ₂ O (mg/ml) | INITIAL (LU/ml) | AKTIVITET | Restaktivitet (%), dage | | | | |
|----|---------------------------|--------------------|---|--------------------|-----------|----------------------------|----|----|----|----|
| | | | | | | 0 | 2 | 13 | 29 | 49 |
| 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 4520 | 100 | 17 | 2 | 1 | 1 |
| | | | | | | | | | | |
| | 2 | 0,50 | 0 | 0 | 4520 | 100 | 93 | 63 | 35 | 34 |
| | | | | | | | | | | |
| 10 | 3 | 0,50 | 0 | 3 | 4720 | 100 | 86 | 76 | 54 | 48 |
| | | | | | | | | | | |
| | 4 | 0 | 0.30 | 0 | 4880 | 100 | 57 | 10 | 1 | 1 |

Disse resultater viser, at 1.2-propandiol (MPG = mono-propylenglycol) er et udmærket stabiliseringstmiddel for Humicola 15 lipase. Lagerstabiliteten blev yderligere forbedret ved tilsætning af Ca salt. Sorbitol har en svagt stabiliserende virkning.

Et vaskeforsøg blev udført med stabiliseret flydende lipasepræparat med følgende sammensætning:

| | | |
|----|--------------------------------------|------------|
| 20 | Humicola lanuginosa DSM 4109 lipase | 5000 LU/ml |
| | 1.2-propandiol | 50% v/v |
| | Deioniseret vand | 50% v/v |
| | CaCl ₂ .2H ₂ O | 3 mg/ml |

Detergentsammensætning: LAS (0,5 g/l), Na₂CO₃ (1,0 g/l)

Temperatur: 30°C

25 Vasketid: 20 minutter

pH: 9,5

Besmudsning: 50 µl olivenolie

Lipasedosering: 1 ml stabiliseret flydende præparat pr. liter vaskeflotte.

Resultater:

| Lipasedosering | Restolie (mg) | n (μ mol) |
|----------------|---------------|----------------|
| LU/l | | |
| 0 | 157 | 507 |
| 5 5000 | 145 | 418 |

EKSEMPEL 10Humicola lipase som støvfrit granulat

En granulatbærer uden enzym blev hovedsageligt fremstillet i henhold til US patentskrift nr. 4,106,991 med følgende 10 sammensætning:

| | |
|-----|-------------------|
| 15% | cellulosefibre |
| 4% | titaniumdioxid |
| 5% | gult dextrin |
| 10% | saccharose |
| 15 | 64% natriumsulfat |

Dette granulat blev sigtet for at opnå en partikelstørrelse på 300-710 μ m.

30,8 g af dette blev be fugtet med 6,2 g af en 30% oplosning i ethanol af polyvinylpyrrolidon (PVP K30, produkt af 20 GAF Corp., USA). Efter grundig blanding blev 12,3 frysetørret H. lanuginosa DSM 4109 lipase (92.700 LU/g, hovedsageligt fremstillet som i eksempel 2) tilsat, og blev grundigt blandet. Granulatet blev tørret (fordampning af ethanol) ved gennemblæsning (fluidisering) ved ca. 50°C. Partikler med partikelstørrelser på 25 300-850 μ m blev opsamlet ved sigtning.

Granulatet blev derefter overtrukket i tre trin som følger:

- 5% polyethylenglycol (MW 600)
- 11,25% TiO₂/Mg silicat (4:1)
- 4% polyethylenglycol (MW 600)

Det overtrukkede granulat blev gennemblæst ved 0,8 m/sekund i 10 minutter for at fjerne fine partikler af overtræksmateriale. Endelig blev materialet igen sightet, og partikler med partikelstørrelser fra 300 til 850 µm blev opsamlet. Et støvfrift, offwhite granulat blev opnået.

Udbytte og aktivitet blev som følger:

| | | | |
|----|-----------------------|-------------|--------|
| 10 | frysetørret pulver | 92.700 LU/g | 12,3 g |
| | uovertrukket granulat | 21.100 - | 45,0 - |
| | overtrukket granulat | 18.200 - | |

Et vaskeforsøg blev udført med det frysetørrede pulver og granulatet som følger:

| | | |
|----|-------------------------|--|
| 15 | Detergentsammensætning: | LAS (0,5 g/l), Na ₂ CO ₃ (1,0 g/l) |
| | Temperatur: | 30°C |
| | Vasketid: | 20 minutter |
| | Lipasedosering: | 6000 LU/l |
| | pH: | 10,0 |
| 20 | Besmudsning: | 50 µl olivenolie |

Resultater:

| <u>Lipasepræparat</u> | <u>n (µ mol)</u> |
|-----------------------|------------------|
| intet | 515 |
| frysetørret pulver | 386 |
| 25 granulat | 415 |

PATENTKRAV

1. Enzymatisk detergentadditiv, hvori den aktive bestanddel er en mikrobielt fremstillet lipase, kendetegnet ved, at lipasen kan fremstilles ved hjælp af en stamme af slægten *Humi-*
5 *cola*, inklusive slægten *Thermomyces*.
2. Enzymatisk detergentadditiv ifølge krav 1, kendetegnet ved, at stammen tilhører *H. lanuginosa*, *H. brevispora*, *H.*
brevis var. *thermoidea* eller *H. insolens*.
3. Enzymatisk detergentadditiv ifølge krav 2, kendetegnet
10 ved, at stammen er *Humicola lanuginosa* DSM 3819 eller 4109,
Humicola brevispora DSM 4110, *Humicola brevis* var. *thermoidea*
DSM 4111 eller *Humicola insolens* DSM 1800.
4. Enzymatisk detergentadditiv ifølge krav 1 - 3, kendetegnet ved, at additivet er tilvejebragt som et ikke-støvende
15 granulat eller en væske.
5. Enzymatisk detergentadditiv ifølge krav 1 - 4, kendetegnet ved, at additivet udover lipasen indeholder et proteolytisk enzym.
6. Enzymatisk detergentadditiv ifølge krav 5, kendetegnet
20 ved, at det proteolytiske enzym er en alkalisk *Bacillus* protease.

7. Detergent indeholdende et enzymatisk additiv, hvis aktive bestanddel er en mikrobielt fremstillet lipase, kendetegnet ved, at det enzymatiske detergentadditiv er det enzymatiske additiv ifølge krav 1 - 6.

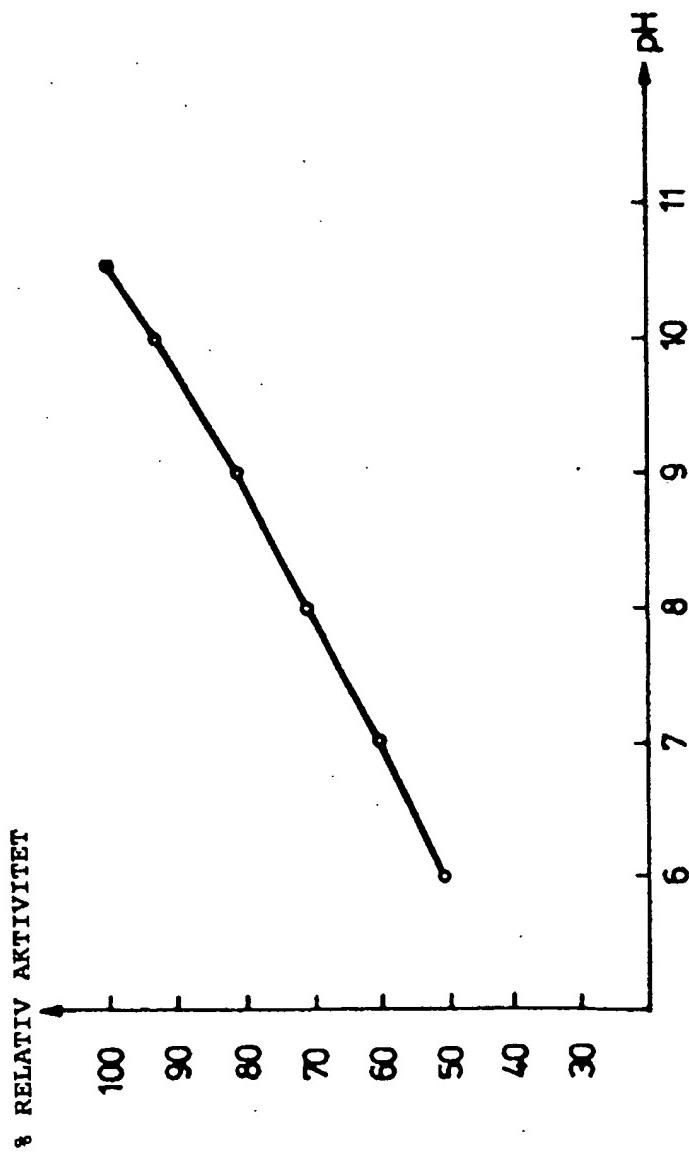
5 8. Detergent ifølge krav 7, kendetegnet ved, at det yderligere indeholder overfladeaktivt stof omfattende fra 30 til 100 vægt-% anionisk overfladeaktivt stof og fra 0 til 70 vægt-% ikke-ionisk overfladeaktivt stof.

9. Detergent ifølge krav 7 og 8, kendetegnet ved, at 10 detergentet yderligere indeholder en protease.

10. Fremgangsmåde til vask af tekstiler, kendetegnet ved, at den foretages ved en pH-værdi, der ligger mellem 7 og 12, og at der som detergent anvendes detergentet ifølge krav 7 til 9.

DK 157560 B

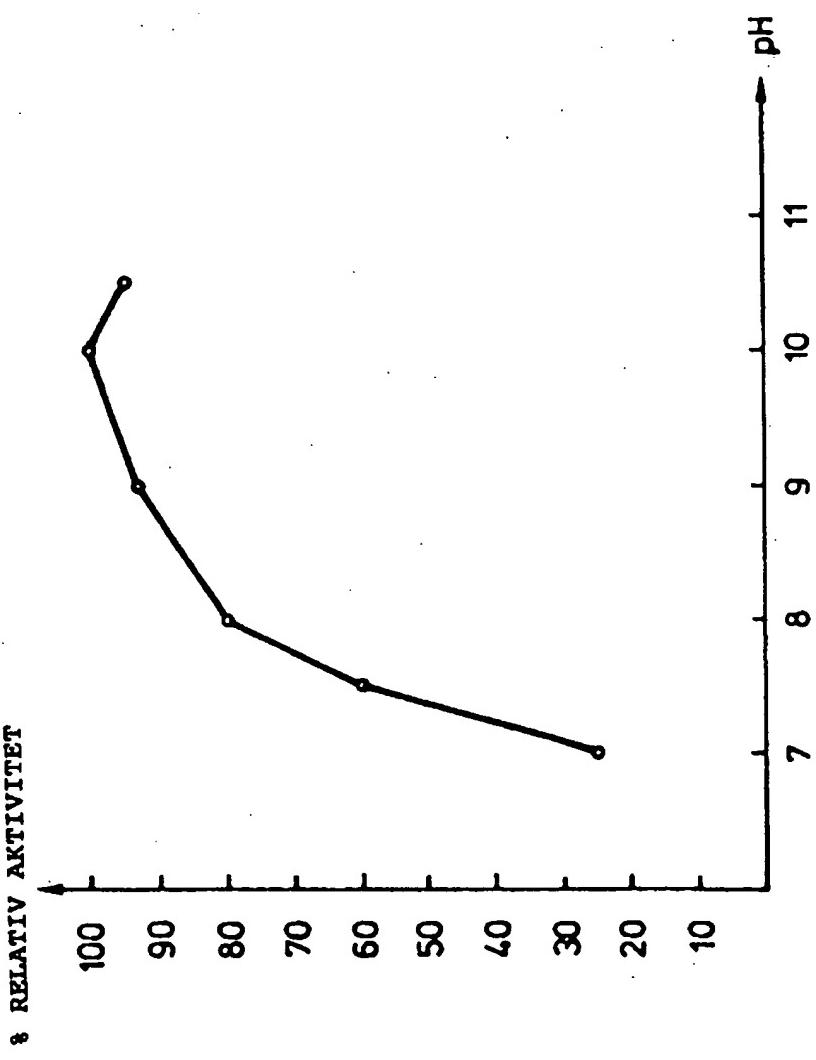
Fig. 1



NZAS-0004151

DK 157560 B

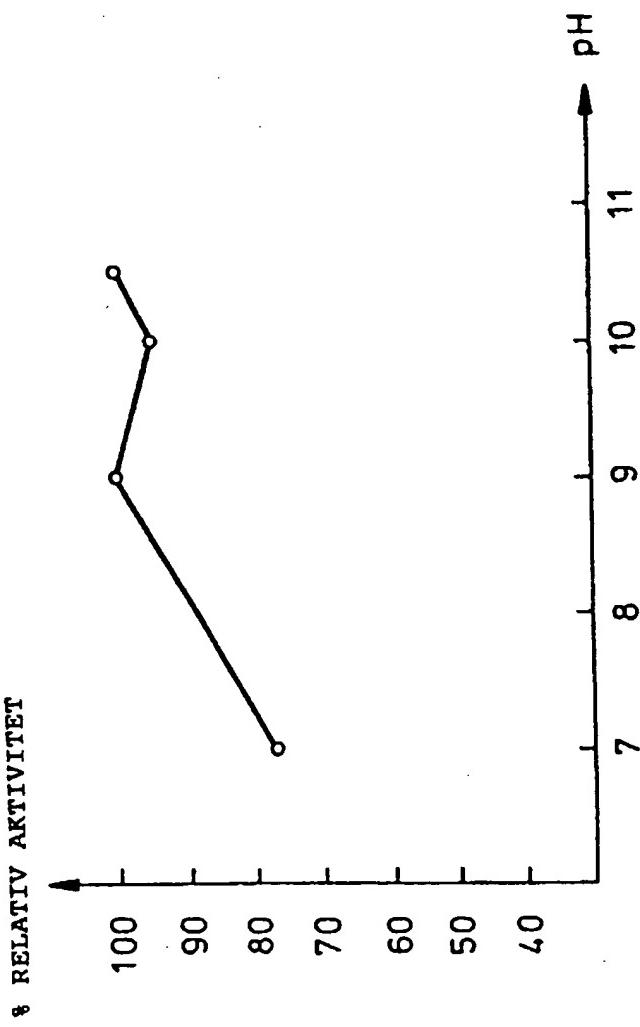
Fig. 2



NZAS-0004152

DK 157560 B

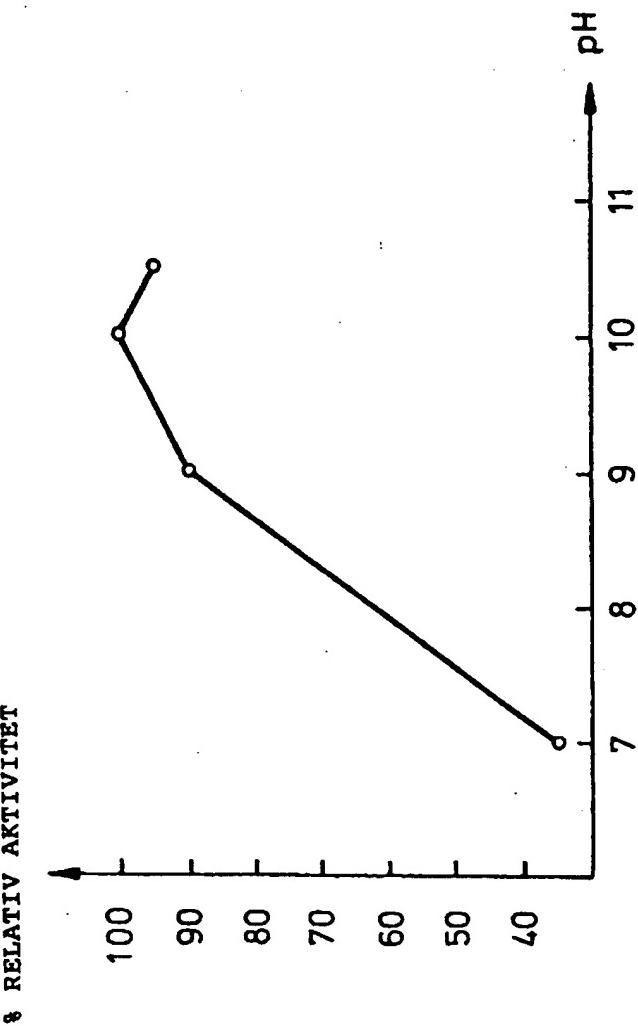
Fig. 3



NZAS-0004153

DK 157560 B

Fig. 4



NZAS-0004154